

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Velimir Nola

Unaprjeđenje protokola za mriješćenje velike kapice, *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758), u kontroliranim uvjetima

DIPLOMSKI RAD

Mentor:

doc. dr. sc. Ana Gavrilović

Komentor:

dr. sc. Sissel Andersen

Dubrovnik, 2012.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ane Gavrilović i suvoditelja dr. sc. Sissel Andersen, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku. Rad je izведен u prostorima IMR (od engl. *Institute of Marine Research*), Austevoll, Norveška.

ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci tijekom školovanja i strpljenju koje su imali za sve nepodopštine koje sam im priredio.

Nadasve se zahvaljujem doc.dr.sc. Ani Gavrilović na svim savjetima i stručnoj pomoći koje su mi uvelike olakšali uspješnu izradu ovoga diplomskog rada.

Zahvaljujem dr.sc. Sissel Andersen na pomoći i savjetima koji su mi pomogli prilikom istraživačkog dijela diplomskog rada, te svim zaposlenicima IMR Austevoll koji su mi omogućili sve potrebne uvjete za izradu diplomskog rada.

Zahvaljujem se mr.sc. Cathinka Krogness na svoj pruženoj pomoći prilikom provođenja istraživačkog dijela diplomskog rada.

Naposljetu (šećer na kraju) zahvaljujem se svom voljenom Suklji na naporima koje je uložila kako bih me potakla na pisanje rada i što mi je savjetima pomogla u statističkoj obradi podataka.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. VELIKA KAPICA, <i>PECTEN MAXIMUS</i> (LINNAEUS, 1758)	3
2.1. STANIŠTE I RASPROSTRANJENOST	3
2.2. EKONOMSKI ZNAČAJ	4
2.3. OSNOVNE MORFO-FIZIOLOŠKE KARAKTERISTIKE	5
2.4. REPRODUKTIVNI CIKLUS.....	6
2.5. MRIJEŠĆENJE U KONTROLIRANIM UVJETIMA.....	8
3. MATERIJAL I METODE	11
3.1. SAKUPLJANJE MATIČNOG JATA.....	11
3.2. KONDICIONIRANJE MATIČNOG JATA	11
3.3. PRIPREME ZA MRIJEŠĆENJE	13
3.4. INDUCIRANJE MRIJEŠĆENJA TEMPERATURNIM ŠOKOM	13
3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SPERMATOZOIDA	14
3.6. ODREĐIVANJE POKRETLJIVOSTI SPERMATOZOIDA.....	15
3.7. ODREĐIVANJE UDJELA SAMOOPLOĐENIH JAJNIH STANICA	15
3.8. UMJETNA OPLODNJA NIZOM RAZLIČITIH KONCENTRACIJA SPERMATOZOIDA	15
3.9. PRAĆENJE DEFORMACIJA RANIH RAZVOJNIH STADIJA	16
3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	16
4. REZULTATI	18
4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SPERMATOZOIDA BROJAČEM COULTER Z2	18
4.2. DINAMIKA POKRETLJIVOSTI SPERMATOZOIDA	18
4.3. STUPANJ SAMOOPLODNJE U RAZLIČITIM SERIJAMA IZBACIVANJA JAJNIH STANICA	19
4.4. UTJECAJ KONCENTRACIJE SPERMATOZOIDA NA USPJEŠNOST UMJETNE OPLODNJE	20
4.5. DEFORMACIJE RANIH RAZVOJIH STADIJA VELIKE KAPICE <i>P.MAXIMUS</i>	21
5. RASPRAVA	23
5.1. METODA ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE SPERMATOZOIDA VELIKE KAPICE <i>P. MAXIMUS</i>	23
5.2. UTJECAJ POKRETLJIVOSTI SPERMATOZOIDA NA USPJEH OPLODNJE	24
5.3. SAMOOPLODNJA VELIKE KAPICE <i>P.MAXIMUS</i> PRIGODOM MRIJEŠĆENJA U KONTROLIRANIM UVJETIMA....	25
5.4. MEĐUSOBNA OVISNOST KONCENTRACIJE SPERMATOZOIDA, USPJEŠNOSTI UMJETNE OPLODNJE I POLISPERMIJE.....	27
ZAKLJUČCI	29
7. LITERATURA.....	30

Unaprjeđenje protokola za mriješćenje velike kapice, *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758), u kontroliranim uvjetima

SAŽETAK

Velika kapica, *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758), vrlo je tražena vrsta za ljudsku prehranu na svjetskom tržištu. Usprkos značajnom komercijalnom potencijalu, akvakulturna proizvodnja još uvijek nije optimizirana što rezultira velikim gubicima u mrjestilištu. Neki od najvažnijih čimbenika koji utječu na uspješnost oplodnje u kontroliranim uvjetima su koncentracija spermatozoida kojom se provodi oplodnja, stupanj samooplodnje jajnih stanica te kvaliteta korištenih spolnih stanica. Povećanjem koncentracije spermatozoida može se postići viši udio oplođenih jajnih stanica, no nedostatkom mehanizama koji sprječavaju prodiranje više spermatozoida u jajnu stanicu prigodom oplodnje (visokim koncentracijama spermatozoida) dolazi do polispermije, koja rezultira letalnim deformacijama embrija. Samooplođene jajne stanice često daju jedinke usporenog rasta, zbog čega ih se nastoji ukloniti. Cilj ovoga rada je stoga bio odrediti koja koncentracija spermatozoida (određivana pomoću brojača Coulter Z2) daje dovoljno visoki udio oplođenih jajnih stanica, ali bez pojavnosti polispermije, koje su jajne stanice obzirom na samooplodnju pogodne za mriješćenje u kontroliranim uvjetima, te koliko dugo spermatozoidi ostaju vijabilni (brzopokretni) za oplodnju pri temperaturi skladištenja nakon njihova ispuštanja iz jedinki *P. maximus* (primjenom temperaturnog šoka). Rezultati pokazuju da spermatozoidi ostaju u gotovo istoj mjeri pokretni unutar prva četiri sata pri obje ispitivane temperature (4 i 17 °C; Kruskal-Wallis test pri obje temperature; p vrijednosti =1). Nakon 8 sati vidljiv je pad brzopokretnih spermatozoida skladištenih pri 17 °C (Kruskal-Wallis test; p vrijednost < 0.000353), dok na temperaturi od 4 °C i dalje zadražavaju dobru pokretljivost (Kruskal-Wallis test; p vrijednost > 0.94). Nadalje, jajne stanice izbačene tek nakon treće serije ispuštanja tijekom induciranih mriješćenja primjenom temperaturnog šoka imaju značajno niži udio samooplođenih jedinki u odnosu na ranije serije (Kruskal-Wallis test; p vrijednost < 0.0316). Uspješnost kontrolirane oplodnje povećavala se porastom koncentracije spermatozoida (od 5 do 10000 spermatozoida po jajnoj stanici; ANOVA test; p vrijednosti < 0.0187), no uz sve izraženije deformacije ranih razvojnih stadija jedinki (zbog rastuće učestalosti polispermije) pri koncentracijama od 100 spermatozoida po jajnoj stanici naviše. Stoga se koncentracija od približno 40 spermatozoida po jajnoj stanici pokazala tijekom ovog istraživanja najboljom za oplodnju velike kapice *P. maximus* u kontroliranim uvjetima u mrjestilištu.

Ključne riječi: *Pecten maximus*, pokretljivost spermatozoida, samooplodnja, koncentracija spermatozoida, polispermija.

Improvement of the spawning protocol of the great scallop, *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758), under controlled conditions

ABSTRACT

Great scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758) is highly valued species for human consumption on the global market. Despite significant commercial potential, its aquacultural production protocol has not been optimized, often causing huge losses in the hatcheries. Some of the most important factors affecting the controlled fertilization in hatcheries are sperm concentration, amount of self-fertilized eggs, and the quality of gametes. Increasing sperm concentration results in higher amount of successfully fertilized eggs, but due to the lack of mechanisms preventing multiple sperm penetration into individual eggs, high sperm concentration causes polyspermy, which leads to lethal deformations of fertilized eggs. On the other hand, self-fertilized eggs often give rise to slowly growing individuals, which are usually being avoided in controlled fertilization protocols. The goal of this study was therefore to determine the optimal sperm concentration (using cell counter Coulter Z2) for satisfying amount of fertilized eggs while avoiding polyspermy, which eggs are suitable for controlled fertilization with respect to the degree of self-fertilization, and finally how long sperm remains viable (highly mobile) for fertilization after release from adult *P. maximus* individuals (by temperature shock treatment). Results indicate that sperm cells remain equally mobile within the first 4h upon their release at both storage temperatures (4 and 17 °C; Kruskal-Wallis tests; p values =1), while after 8h portion of highly mobile sperms stored at 17 °C decreases significantly (Kruskal-Wallis test; p value < 0.000353), on contrast with those stored at 4 °C, which remain stable (Kruskal-Wallis test; p value > 0.94). Eggs released after third temperature shock-induced releasing of gametes from adult individuals have significantly lower degree of self-fertilized eggs, compared to previous ones (Kruskal-Wallis test; p vrijednost < 0.0316). Amount of successfully fertilized eggs was increasing with the increasing sperm concentration (from 5 to 10000 sperms per egg; ANOVA test; p values < 0.0187), however with visible signs of deformations of early developmental stages (due to frequent occurrence of polyspermy), starting at concentration of 100 sperms per egg cell. Therefore, concentration of approximately 40 sperms per egg is most likely optimal for controlled fertilization of great scallop *P. maximus* in hatcheries.

Key words: *Pecten maximus*, sperm motility, self-fertilization, sperm concentration, polyspermy

1. UVOD

Velika kapica, *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758), vrlo je tražena vrsta za ljudsku prehranu na svjetskom tržištu. Tijekom zadnjih godina interes za proizvodnju ove vrste u akvakulturi se iznimno povećao, no ipak je njezin uzgoj i dalje veoma malen u odnosu na izlov iz prirodnih populacija. Prema podacima FAO-a (2010) godišnji izlov iznosi oko 50,000 t, dok se u akvakulturi proizvede samo 60 – 150 t (FAO, 2010).

Ova je vrsta školjkaša na tržište dolazila samo iz izlova prirodnih populacija do sredine 70-ih godina prošlog stoljeća. U tom je razdoblju došlo do njenog prirodnog kolapsa uz obale Francuske (Boucher i Dao, 1989), što je uzrokovalo nagli razvitak tehnologije mriješćenja i pokušaje uzgoja mlađi u kontroliranim uvjetima unutar mrjestilišta.

U usporedbi s tradicionalnim tehnikama prikupljanja mlađi iz prirodnih populacija, uzgoj u mrjestilištu predstavlja sigurniji način pribavljanja dovoljnih količina mlađi za akvakulturu (Helm i sur., 2004; Strand i Vølstad, 1997; Dao i sur., 1999; Slater, 2005). Prva mrjestilišta ovog školjkaša u Europi su se pojavila ranih 70-ih (Comely, 1972; Gruffydd i Beaumont, 1972), pri čemu je tehnologija mriješćenja razvijana intenzivno u Francuskoj 80-ih, a nakon toga i u Ujedinjenom Kraljevstvu, Irskoj i Norveškoj (Utting i Millican, 1997; Dao i sur., 1999; Bergh i Strand, 2001). Nažalost, dostupnost mlađi na svjetskom tržištu je i dalje ograničena, a broj mrjestilišta se do danas nije povećao s početna 3 – 4 (Dao i sur., 1999). Razlog tomu predstavlja još uvijek nedovoljno razvijena tehnologija mriješćenja ove vrste školjkaša u kontroliranim uvjetima (Bergh i Strand, 2001; Le Pennec i sur., 2003; Magnesen i sur., 2006).

Neki od najvažnijih čimbenika koji utječu na uspješnost mriješćenja ovog funkcionalnog hermafrodita u kontroliranim uvjetima su: koncentracija spermatozoida kojom se provodi oplodnja, stupanj samooplodnje jajnih stanica, te kvaliteta korištenih spolnih stanica. Povećanjem koncentracije spermatozoida može se postići viši udio oplođenih jajnih stanica, no nedostatkom mehanizama koji sprječavaju prodiranje više spermatozoida u jajnu stanicu prilikom oplodnje (visokim koncentracijama spermatozoida) dolazi do polispermije koja rezultira letalnim deformacijama embrija. Samooplođene jajne stanice često daju jedinke usporenog rasta, zbog čega ih se nastoji ukloniti iz uzgoja (Beaumont i Budd, 1983; Ibarra i sur., 1995; Campbell i sur., 2001; Dong i sur., 2012; Le Pennec i sur., 2002).

Cilj ovoga rada je stoga bio odrediti koja koncentracija spermatozoida (određivana pomoću brojača Coulter Z2) daje dovoljno visoki udio oplođenih jajnih stanica, ali bez pojavnosti polispermije. Uz navedeno, željeli smo utvrditi koje su serije jajnih stanica s

obzirom na stupanj samooplodnje najpogodnije mriješćenje u kontroliranim uvjetima, kao i koliko dugo spermatozoidi ostaju vijabilni (brzopokretni) za oplodnju pri temperaturi skladištenja nakon njihova napuštanja roditeljskih jedinki (primjenom temperaturnog šoka).

2. VELIKA KAPICA, *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758)

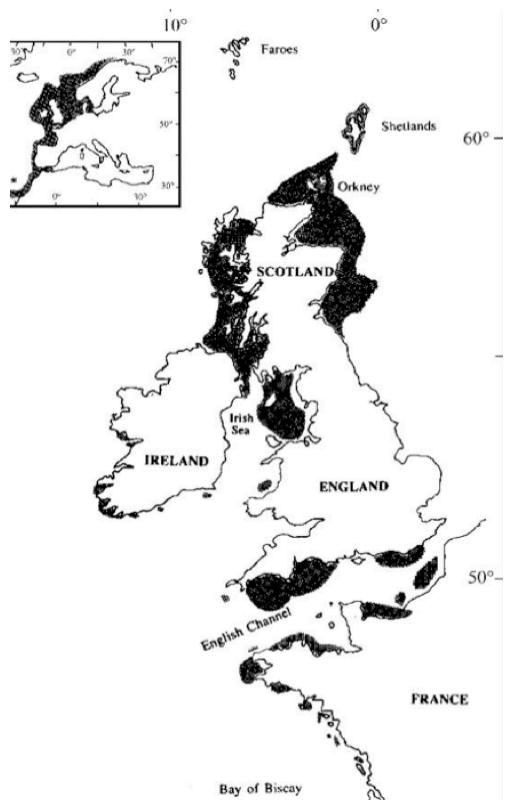
2.1. Stanište i rasprostranjenost

Porodica *Pectenidae* široko je rasprostranjena u gotovo svim morima i oceanima diljem Zemlje, međutim samo su relativno velike vrste koje se pojavljuju u dovojnoj abudanciji zanimljive su za komercijalni ribolov. Staništa su im uglavnom na većim geografskim širinama, pa se sva kvalitetna lovna područja nalaze između 30° i 55° geografske širine na južnoj i sjevernoj polutci (Shumway i Parsons, 2006).

Velika kapica, *Pecten maximus* (Linneaus, 1758), vrlo je tražena vrsta za ljudsku prehranu na svjetskom tržištu, pa je velika potražnja i visoka cijena čine iznimno atraktivnom za akvakulturu (Strand i Vølstad, 1997). Nastanjuje područja istočne obale Sjevernog Atlantika, od sjevera Norveške (Lofoten Islands 69N°) do juga Iberskog poluotoka (Tebble, 1966)(Slika 1). Prisutnost velike kapice povremeno je utvrđena i uz obale zapadne Afrike, Azore, Kanarske otoke i Madeiru (Mason, 1983). Poznata su staništa i u Sredozemnom moru, pretežito uz obale Costa del Sol u Španjolskoj, i to od ušća rijeke Guadiaro prema istoku do La Caleta de Valez u provinciji Malaga (Cano i Garcia, 1985).

Komercijalna ribolovna područja velike kapice *P. maximus* su brojna, ali malena površinom i uglavnom se nalaze uz obale Francuske i Britanskih otoka, a najpoznatija su Zaljev St. Breuc, zaljev Seine, istočni i zapadni dio Engleskog kanala, Sjevernog Irskog mora i otoka Man i Clyd, zapadno od Kyntire, Orkny, Shetland i Moray Firth (Shumway i Parsons, 2006).

Vrsta naseljava dubine od jednog do 183 m (Forbes i Hanley, 2007), no većinom 20 – 45 m. Dna na kojima obitava najčešće su pješčana, pješčano – šljunčana, šljunčana a ponekad i muljevita (Mason, 1983).



Slika 1. Geografska rasprostranjenost velike kapice *P. maximus* (preuzeto iz: Mason, 1983)

2.2. Ekonomski značaj

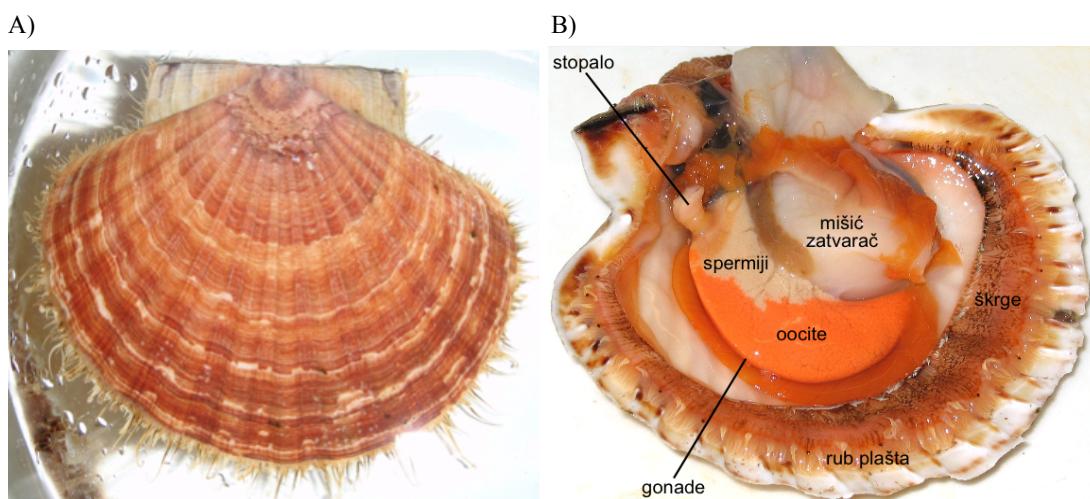
Podaci o izlovu školjkaša *P. maximus* u Belgiji, Kanalskom otočju, Francuskoj, Irskoj, na otoku Man, Španjolskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu postoje još od 50-ih godina prošlog stoljeća. Od 1990. godine prijavljivanje izlova ove vrste školjkaša započele su i Nizozemska, Norveška i Portugal. Prema prijavljenim podacima ukupni izlov je 80-ih godina iznosio oko 20 000 t, dok je od 2004. godine porastao na oko 50 000 t (FAO, 2010). Globalno gledajući izlov je u zadnjem desetljeću poprilično usporio svoj u počecima nagli rast (Bourne, 2000; FAO, 2010). S druge strane, podaci o uzgoju ove vrste postoje od sredine 80-tih godina (za Španjolsku i Ujedinjeno Kraljevstvo), a sredine 90-ih godina za Kanalske otoke, Francusku i Irsku. Proizvodnja je povećana sa 150 na 434 t (vrijednost 600,000–2,047,000 US\$) u periodu od 1985 - 1996, ali je opala na 141 t (vrijednost 754,000 US\$) u 2000. godini. Od 2000. do 2007., prema podacima zablježenim na području Europe uzgojeno je oko 68 t (vrijednost 562,000 US\$), uglavnom zato jer Francuska i Španjolska nisu prijavile svoj uzgoj (FAO, 2010). Ovako niske vrijednosti vjerojatno su posljedica prepravljanja podataka koji su poslani FAO-u ili pojave toksina ASP u Europskim vodama koji ima velik utjecaj na akvakulturu (Campbell i sur., 2001; Liu i sur., 2007, 2008).

2.3. Osnovne morfo-fiziološke karakteristike

Velika kapica *P. maximus* ubraja se u porodicu Pectinidae. Boja školjkaša je žućkastosmeđerumena. Ljuštture su nejednake pri čemu je lijeva crvenosmeđe boje i ravna, dok je desna svjetlija, konveksna i prelazi preko rubova lijeve. Na vanjskoj površini obje ljuštture zrakasto je raspoređeno 12 - 17 izraženih rebara oštrog bočnog ruba između kojih su jasno vidljive zrakaste brazde. Brava koja povezuje obje ljuštture je bez zuba, sa slabim naborima. Otvaranje ljuštture, pored brave omogućuje dobro razvijeni mišić zatvarač (Poppe and Gotō, 1993; Poutiers, 1987; Tebble, 1966; Vera, 1992).

Najduža osovina ljuštture ovog školjkaša prelazi 150 mm u većini područja (Ansell i sur., 1991), a životni ciklus može biti duži od 20 godina (Tang, 1941; Orensanz i sur., 1991). Spolnu zrelost u toplijim klimatskim područjima doseže pri starosti od dvije do tri godine pri veličini 100 – 110 mm. U hladnijim, odnosno sjevernijim geografskim područjima spolno sazre tek u dobi od četiri do šest godina (Tang, 1941; Mason, 1957). U najtoplijim područjima južnih geografskih širina, spolnu zrelost velika kapica može doseći nakon samo jedne godine pri veličini od 100 mm (Acosta i Roman, 1994).

Izgled i položaj unutrašnjih organa školjkaša nakon skidanja lijeve ljuštture prikazan je na slici 2.



Slika 2. Vanjski izgled (A) i položaj unutrašnjih organa velike kapice *P. maximus* nakon odvajanja lijeve ljuštture (B).

Kao i svi školjkaši, školjkaš *P. maximus* hrani se filtriranjem morske vode iz koje pomoću trepetljika smještenih na škrгama izdvajaju čestice hrane. Izdvojene čestice potom se transportnim putevima škrга i usnih palpa prenose do usta. Čestice unesene u probavni sustav

školjkaša predstavljaju mješavinu planktonskih organizama, bakterija, organskog detritusa i anorganskih čestica, zajedno s nakupinama razgrađenih organskih molekula iz okolne vode (Bricelj i Shumway 1991).

2.4. Reproduktivni ciklus

Velika kapica *P. maximus* je funkcionalni hermafrodit, pa se unutar gonada istovremeno nalaze i muške i ženske spolne stanice. Gametogenetska aktivnost počinje tijekom druge godine života, pri čemu je potrebno nekoliko mjeseci kako bi gonade bile spremne za mriješćenje. U tom trenutku gonade se sastoje od narančasto obojenog ovarija i sivo-bijelog testisa (Mason, 1958).

Reproducitivni ciklus ovisi generalno o temperaturnim uvjetima, te su u Francuskoj i Norveškoj (Strand i Nylund, 1991; Magnesen i Christophersen, 2008) utvrđena njegova dva različita tipa:

- 1) obnavljanje gonada odmah nakon procesa mriješćenja;
- 2) stagnacija gametogeneze preko zime tj. do iduće sezone povoljnih temperaturnih uvjeta.

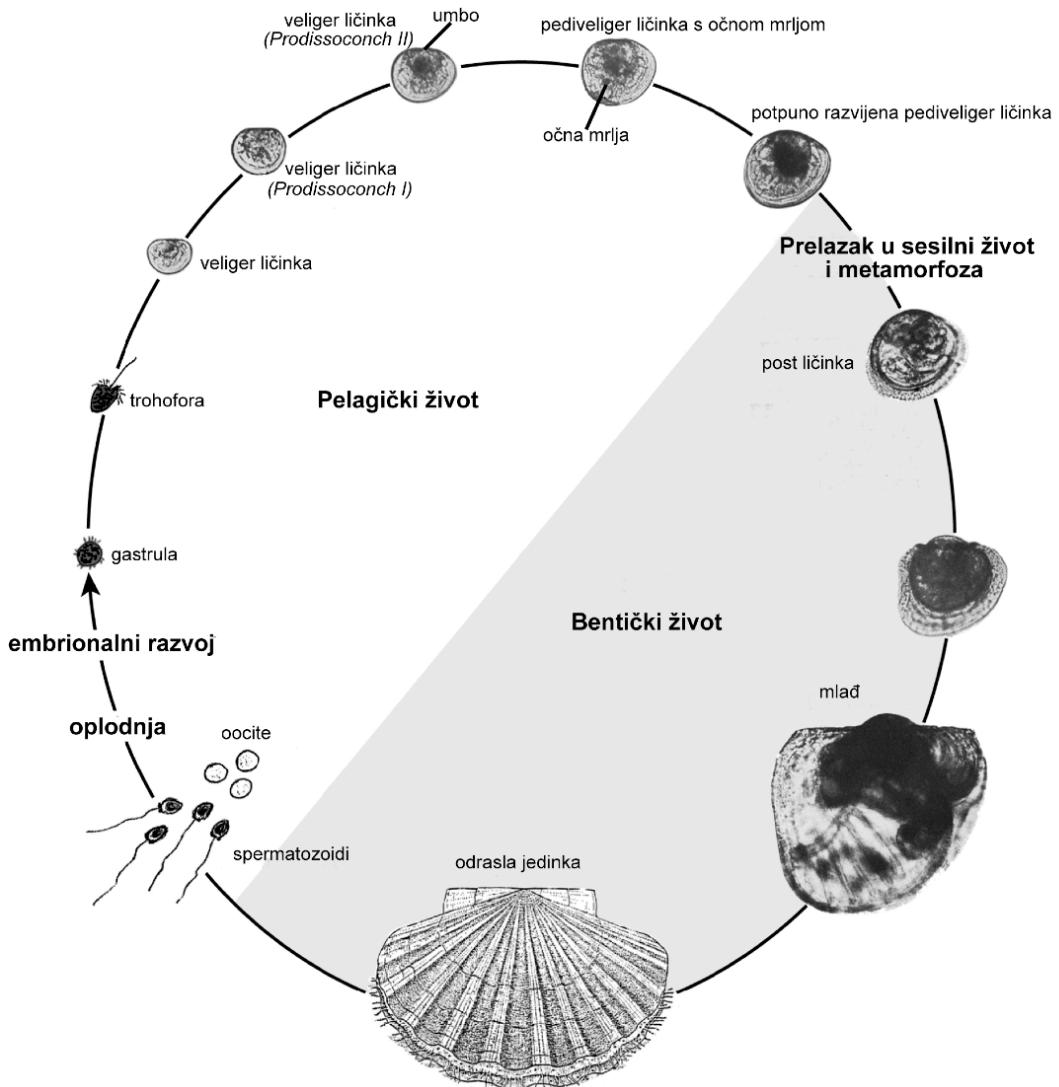
Prema Masonu (1958), sam razvoj gonada može se podijeliti u pet faza:

1. Gonade su smeđe, a razlika između ovarija i testisa je praktički nevidljiva. Testis je ponekad malo svjetlijе obojen i moguće je vidjeti nekoliko folikula;
2. Gonade su vidljivo podjeljene u narančasti ovarij i bijeli testis, dok su folikuli i dalje maleni, a cijela petlja alimentarnog kanala je vidljiva ispod gonada;
3. Folikuli su veći i gušći, no i dalje ima prostora među njima. Alimentarni kanal je teško vidjeti, ali je jasno vidljivo zadebljanje na gonadama gdje se kanal nalazi;
4. Gonade su mlitave, a folikuli su nabijeni skupa. Zadebljanje gonada je vidljivo samo na krajnjem dijelu alimentarnog kanala;
5. Gonade su glatke i zaobljene, folikuli se nalaze jako blizu, a kanal je skoro nevidljiv.

Razvoj gonada do stadija zrelih oocita i spermatozoida traje oko dva mjeseca. Unutar gonada se uvijek nalazi nekoliko različitih stadija oocita, iako prevladava jedan stadij (Mason, 1958).

Spolno zrela jedinka *P. maximus*, stara otprilike tri godine, ispusti između 15 000 000 i 21 000 000 jajnih stanica tijekom procesa mriješćenja. S obzirom da se radi o funkcionalim hermafroditima, ovociti i spermatozoidi se tijekom mriješćenja sinkronizirano ispuštaju, te vrlo često dolazi do samooplodnje. Ispuštanje spermatozoida obično traje oko 60 minuta, dok

jajne stanice jedinka izbacuje do 30 min (Le Pennec i sur., 2003). Embriogeneza traje od trenutka oplodnje sve dok se ne razvije veliger ličinka stadija Prodissococonch I. Promatranja ovog stadija su limitirana na laboratorijske uvjete (slika 3). Iako brzina razvitka ovisi o temperaturi, otprilike se unutar osam do 12 h razvija pokretna gastrula s trepetljikama (Casse, 1995). Nakon 24 h razvija se stadij trohofore pri temperaturi od 16 – 17 °C (Comely, 1972), dok se nakon 48 h u potpunosti razvija veliger ličinka (D stadij) (Le Pennec, 1974; Cragg i Crisp, 1991). Na 19 °C prve se jedinke u veliger stadiju (D stadij) mogu zamjetiti već nakon 30 h (Casse, 1995). Ličinački stadij traje oko 25 dana (Robert i Gérard, 1999), ovisno o uvjetima sredine i ishrani. Le Pennec i sur. (2003) navode da cijela pelagička faza traje od 18 – 42 dana, obuhvaća razdoblje od stadija Prodissococonch I i II, pa sve do formiranja pediveliger ličinke koja je spremna za metamorfozu (slika 3). Prodissococonch I stadij ima dobro razvijen velum, koji predstavlja organ za kretanje i hranjenje. Od ostalih ličinačkih stadija razlikuje se po razvijenosti mekog tkiva i ljuštture te veličini (<100 µm). U stadiju Prodissococonch II se razvija umbo, a nakon toga slijedi stadij pediveliger. U ovom se stadiju razvija prvo očna mrlja, a potom stopalo, što je glavni znak da je ličinka u zadnjem stadiju pelagičkog života (razvijena pediveliger ličinka), te da će uskoro biti spremna za prelazak na bentoski način života. Prigodom spuštanja u bentos obilježava je dupli prsten ljušturice i karakteristično kretanje blizu dna u potrazi za pogodnim supstratom (Le Pennec i sur., 2003).



Slika 3. Reproduktivni ciklus i razvojni stadiji školjkaša *P.maximus* (Prilagođeno po: Le Pennec i sur., 2003).

2.5. Mriješćenje u kontroliranim uvjetima

Uspješna proizvodnja mlađi u mrjestilištu ponajprije ovisi o dostupnosti jedinki sa zrelim gonadama za mriješćenje. Zrele jedinke su se u prošlosti izlovljavale iz prirodnih populacija te bi se nakon toga induciralo kontrolirano mriješćenje (Comely, 1972; Gruffydd i Beaumont, 1972). Zbog loše kontrole pri spomenutom načinu mriješćenja započelo se s kondicioniranjem matičnog jata, tj. održavanjem u kontroliranim uvjetima kojima se nastoji uspostaviti optimalni razvoj gonada. Time se u konačnici nastoji u što kraćem vremenu i neovisno o prirodnim uvjetima osigurati dovoljan broj odraslih jedniki spremnih za mriješćenje. Za uspješno kondicioniranje matičnog jata, kao i uspješan dalji razvitak ličinki potrebno je poznavati prirodni reproduktivni ciklus i potrebe ciljne vrste. Navedeno se svakako odnosi na vanjske čimbenike kao što su temperatura, svjetlost, hrana i slanost, ali i unutarašnje

čimbenike kao što su hormoni i razni neurološki čimbenici. Skup svih navedenih čimbenika različit je za svaku vrstu, stoga ih je potrebno odrediti i optimizirati za ciljanu vrstu kako bi se ostvarilo što uspješnije mriješćenje (Shumway i Parsons, 2006; Jug-Dujaković i sur., 2010a;b; Gavrilović i sur., 2010a;b).

Neki od najvažnijih čimbenika za to kod vrste *P.maximus* uključuju vijabilnost i koncentraciju spermatozoida kojom se provodi oplodnja u mrjestilištu. Pokazatelj vijabilnosti spermatozoida je svakako njihova pokretljivost, koja opada u vremenu i stoga je važno odrediti vremenski interval unutar kojega oni ostaju dovoljno pokretni pri određenoj temperaturi kako bi se osigurali vijabilni spermatozoidi za sam proces oplodnje u kontroliranim uvjetima (Faure et al., 1994).

Koncentracija spermatozoida koja se koristi prigodom mriješćenja neobično je važan čimbenik, ne samo zbog postotka oplođenih jajnih stanica, već i zbog izostanka mehanizma koji spriječavaju polispermiju prigodom mriješćenja, pojavu da pri oplodnji više od jednog spermatozoida može prodrijeti u jajnu stanicu (Beaumont i Budd, 1983). Ta pojava je česta pri izrazito visokim koncentracijama spermatozoida tijekom oplodnje u kontroliranim uvjetima i uzrokuje deformacije ranih razvojnih stadija i visoke mortalitete (Dong i sur., 2012), koje bi u mrjestilištima trebalo izbjegći. Stoga je potrebno odrediti minimalnu koncentraciju spermatozoida za zadovoljavajući postotak oplođenih jajnih stanica, uz što manje jedinki pogodenih polispermijom (Andersen, usmeno priopćenje).

Već i sam protokol za određivanje koncentracije spermatozoida ove vrste prilično je neprecizan i neučinkovit. Naime, često se koncentracija određuje brojanjem spermatozoida oko jajne stanice pod svjetlosnim mikroskopom, dakle u dvodimenzionalnom prikazu (Andersen, usmeno priopćenje). U takvim je uvjetima uvelike prisutna mogućnost ljudske pogreške u brojanju prvenstveno zbog vrlo male veličine spermatozoida (glava spermatozoida ima promjer $\sim 3.5 \mu\text{m}$) (Le Pennec i sur., 2002), koji mogu biti i ispod jajne stanice i time oku nevidljivi. Vjerojatnost je stoga da je koncentracija spermatozoida u stvarnosti često veća od one određene, te je pojavnost polispermije zbog nepravilnog brojanja previsoka (Andersen, usmeno priopćenje).

Kao što je već spomenuto, vrsta *P. maximus* je sinkroni hermafrodit, što prigodom procesa mriješćenja predstavlja problem jer tijekom naizmjeničnog ispuštanja sperme i ovocita dolazi do samooplodnje (Campbell i sur., 2001; Liu i sur., 2007, 2008). Općenito bi se za porodicu Pectenidae moglo reći da samooplođene jedinke u brojnim slučajevima imaju sporiji rast i veći mortalitet, što je pokazano za vrstu *Argopecten circularis* (Ibarra i sur., 1995). Za vrste *Argopecten irradians* i *Argopecten purpuratus* neka su istraživanja utvrdila da

nema razlike između samooplođenih jedinki i onih dobivenih kontroliranom oplodnjom (Wilbur i Gaffney, 1991; Winkler i Estévez, 2003), dok druga istraživanja ipak ukazuju na usporenu stopu rasta i veći mortalitet samooplođenih jedinki (Choromanski i Stiles, 1995; Martinez i sur., 2007; Liu i sur., 2011). Slične pojave zabilježene su i kod nekih drugih vrsta, primjerice kod mediteranske dagnje *Mytilus galloprovincialis*, koja je odvojenog spola te se ponekad dogodi da jedinka posjeduje muške i ženske gonade, a to rezultira samooplođenim jedinkama koje imaju usporen rast, visoku stopu mortaliteta, kao i brojne deformacije uzrokovane smanjenim brojem alela (Beaumont i Matin-Abdul, 1994). Budući da velike kapice izbacuju jajne stanice u više navrata (serija), na početku procesa javlja se veći udio samooplođenih jajnih stanica (Beaumont i Budd, 1983), što je uglavnom nepoželjno za komercijalno mriješćenje, i stoga je potrebno odrediti koje su serije prikladne za uspješno mriješćenje, tj. da imaju što manji udio samooplođenih stanica.

Iz navedenih razloga mrjestilišta ove vrste suočavaju se s brojnim problemima prigodom kontroliranog uzgoja te se zapravo rijetko sa sigurnošću unaprijed može predvidjeti količina godišnje proizvodnje mlađi. Povijest je pokazala da rezultati u mrjestilištu znatno variraju, a često nije poznato zbog čega dolazi do visokog mortaliteta ličinki i ranih postličinakčkih stadija. Svrha ovog rada je stoga detekcija problema koji uzrokuju visoki mortalitet ličinki prigodom mriješćenja u mrjestilištu (polispermija, samooplodnja) kako bi se optimizirali uvjeti i tehnologija procesa mriješćenja, uključujući prvenstveno kvalitetu spermatozoida i njihovu koncentraciju za kontroliranu oplodnju, učinkovitiji protokol za određivanje same koncentracije spermatozoida, te na koji način izbjegći visoku pojavnost samooplodnje i polispermije. Uspješnijim mriješćenjem proizvodnja mlađi u mrjestilištu postala bi (više) isplativa, te bi došlo do ubrzanog rasta proizvodnje velike kapice *P. maximus*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Sakupljanje matičnog jata

Matično jato prikupljeno je iz lokalne populacije koja se nalazi u vanjskom djelu regije Hardangerfjord na zapadnoj obali Norveške. Sakupljanje je obavljeno ronjenjem (tvrtka Norskjell AS) sredinom siječnja 2012. Tijekom transporta školjkaši su se nalazili u stiropornim kutijama, okruženi vlažnim materijalom. Sam transport jedinki iz regije Hardangerfjord u Norveškoj do IMR Austevoll trajao je četiri sata, nakon čega su jedinke očišćene od obraštaja ribanjem i struganjem u morskoj vodi temperature 8°C. Nakon temeljitog čišćenja matično je jato raspoređeno u 2 tanka (15 jedinki / tanku) volumena 1000 l (dimenzije: 1.13m x 0.8 m).

3.2. Kondicioniranje matičnog jata

Protok vode unutar tankova je bio konstantan i izosio $3\text{ l morske vode min}^{-1}$. Hrana (alge) je dodavana u vodu automatski neposredno prije ulaza u tankove. Svjetlo unutar prostorije za kondicioniranje matičnog jata namješteno je na rani ljetni ciklus, gdje je omjer dan : noć bio 16 h : 8 h. Pored toga, za imitiranje sumraka i zore korišteno je lagano 30-minutno zatamnjenje, odnosno posvjetljenje. Tijekom perioda adaptacije temperatura unutar tankova bila je 9 – 10 °C, te je tijekom dva dana povećavana postupno na 12.5 °C, kako bi se započelo s kondicioniranjem. Kondicioniranje je trajalo od 6 – 8 tjedana. Razlog navedenog trajanja je dugogodišnje korištenje ovog načina kondicioniranja u komercijalnom mrjestilištu Scalpro AS koje se nalazi u istoj regiji (Øygarden, zapadna obala Norveške). Tijekom kondicioniranja prehrana školjkaša sastojala se od smjese algi sljedećih vrsta i omjera:

Isochrysis galbana (Tahićanski soj): *Pavlova lutheri*: *Chaetoceros mulleri* = 1:1:2.

U svaki tank dodavala se teoretski izračunana koncentracija stanica ekvivalentna 13 – 14 standardiziranih stanica volumena $50\text{ }\mu\text{m}^3$ po μl morske vode koja je utjecala u tankove. Smjesa hrane odabrana je imajući u vidu činjenicu da prehrana bogata algom *Isochrysis galbana* (Tahićanski soj) pogoduje većem preživljavanju ličinki tijekom proljetno - ljetnog mriješćenja, dok povećana koncentracija kremenjašica u prehrani ima pozitivan utjecaj na preživljavanje tijekom zimskog procesa mriješćenja (Andersen i Ringvold, 2000). Prije spomenuta smjesa algi pripremala se tri puta tjedno, te je dodavana u tankove za hranjenje u

kojima bi se razrijedila s 500 – 600 l morske vode. Tako razrijedena bi se iz tankova za hranjenje konstantno ispumpavala 2 – 3 dana, uz dotok vode za tankove.



Slika 4. Sustav za kondicioniranje matičnog jata. A) Tankovi s algama za prehranu matičnog jata; B) Matično jato u tankovima za kondicioniranje (Foto: Sissel Andersen).

Koncentracija algi unutar tanka za hranjenje iznosila je 710 000–830 000 stanica ml^{-1} . Alge su uzgajane u plastičnim vrećama volumena 100 l do koncentracije od 1.6-21.0 milijuna stanica ml^{-1} . Osvjetljenje korišteno za uzgoj se sastojalo od četiri florescentne neonske cijevi (58 W/neonskoj cijevi), dok je koncentracija CO_2 u dovodu zraka u vreće za uzgoj bila 0.8 %. Kultura algi se koristila za hranu kada bi se nalazila u ranoj stacionarnoj fazi, najčešće 1-2 puta i to 4 – 8 dana nakon nasadijanja kulture (inokulacije).

Kvaliteta svake kulture (količina drugih mikroorganizama u kulturi) je provjeravana više puta tjedno. Kulture koje bi bile loše kvalitete (visoka koncentracija bakterija, neobojeni flagelati) odmah bi se odbacile, te bi se nasadila nova kultura.

Protok vode unutar tankova za kondicioniranje provjeravan je svakog dana očitavanjem na mjeraču protoka i prilagođavan ako ne bi bio na odgovarajućoj razini. Pet dana unutar tjedna bi se mjerio protok iz tankova s hranom prema tankovima za kondicioniranje, dok se temperatura vode mjerila dnevno OxyGuard ručnim sondama.

3.3. Pripreme za mriješćenje

Dan prije početka mriješćenja oprema koja će biti korištena (staklene posude, akvarij za mrijest, plastično posuđe) i sve radne površine prvo su isprane toplom vodom, a nakon toga je na suhu površinu nanesen etanol (70%) kako bi se uništili svi patogeni mikroorganizmi (bakterije, gljivice i sl.) koji bi mogli prouzrokovati neuspješni proces mriješćenja. Pod unutar prostorije je temeljito očišćen od prljavštine i opran toplom vodom. Svi otvori i odvodi su zatvoreni, kako bi unutrašnja temperatura bila konstantna.

3.4. Induciranje mriješćenja temperaturnim šokom

Mriješćenje školjkaša *P. maximus* inducirano je temperaturnim šokom, i to postupnim povećavanjem temperature s 12°C na 18°C. Na dan induciranja, jedinke iz matičnog jata bi se premjestile u tank za mriješćenje. U tanku za kondicioniranje temperatura morske vode bila je 12°C, te se stoga prije premještanja jedinki ispunio morskom vodom iz tanka za mriješćenje kako jedinke ne bi doživjele šok. Nakon prebacivanja jedinki u tank za mriješćenje na njega bi se spojio dotok tople morske vode od 18°C kako bi se postupno povisila temperatura. Dotok tople vode je bio spor, čime bi se izbjegao nagli rast temperature. Bazen je bio kvadratnog oblika, izgrađen od pleksiglasa kako bi se što lakše moglo zamjetiti ispuštanje sperme ili ovocita.

Nakon pola sata od početka tretmana temperatura vode u bazenu bila je veća od 16°C i tada se moglo očekivati prvo ispuštanje gameta u vodenim stupacima. Najčešće su školjkaši prvo ispuštali muške spolne stanice tj. spermatozoide iako bi također neka jedinka povremeno prvo ispuštala jajne stanice. Nakon prvog ispuštanja gameta morska voda u tanku se promiješala kako bi sve jedinke osjetile da je mriješćenje započelo. Nakon toga su se jedinke iz prostorije za kondicioniranje prebacile u prostoriju za mriješćenje, gdje ih se dalje tretiralo u staklenim posudama volumena 3 – 5 l, kako bi se izbjegla samooplodnja i što lakše kontrolirao proces mriješćenja, odnosno sakupljalo uzorke.



Slika 5. Kontrolirano mriješćenje. Na gornjem dijelu slike vidimo osam jedinki u zasebnim posudama za mriješćenje. Pored svake posude se nalazi čašica od 50 ml, koja je služila za sakupljanje uzorka sperme. U donjem lijevom dijelu slike je jedinka koja se još nije izmrijestila (okolna voda je prozirna), dok je u donjem desnom dijelu slike jedinka koja je upravo izbacila jajne stanice (Foto: Sissel Andersen).

Najčešće su jedinke prvo ispuštale u više navrata spermu, a tek nakon nekoliko sati jajne stanice. Jajne stanice nisu ispuštane sve odjednom, već u nekoliko navrata (serija; do 10 puta), a zatim je slijedilo ponovno ispuštanje sperme. Kada dođe do ponovnog ispuštanja sperme mriješćenje za jedinku koja je prošla prije spomenuti proces se smatra završenim zbog toga što ne može doći do ponovnog ispuštanja jajnih stanica (Sissel, usmena predaja). Po završetku mriješćenja, pregledani su uzorci ovocita i sperme, kako bi se provjerila njihova kvaliteta.

3.5. Određivanje koncentracije spermatozoida

Koncentracija spermatozoida je određivana pomoću brojača Coulter Z2 (Beckman-Coulter Inc.). Brojač na temelju poremećaja vodljivosti zbog prolaska stanica (određene veličine, tj. volumena) računa volumen stanica i njihov broj, odnosno koncentraciju. Uredaj je prije upotrebe bio kalibriran te namješten na mjerjenje čestica veličine od 2.5 – 8 μm . Koncentracija je praćena u volumenima uzorka od 50 μl , te se po potrebi razrjeđivala kako bi se dobila željena koncentracija spermatozoida po jajnoj stanici.

3.6. Određivanje pokretljivosti spermatozoida

Spermatozoidi su snimani pomoću kamere (Canon 5D MARK II pričvršćene na mikroskop Olympus BX60), u kratkim video isjećima do 15 s te je na posljeku svaki video analiziran zasebno. Uzorci su snimani nakon 5, 10, 20, 40, 80, 160, 240, 480, 1440 min po ispuštanju sperme. S obzirom da su uzorci uzimani nakon 10, 20 i 40 minuta bili gotovo istovjetni uzorku uzetom nakon pet minuta, u rezultatima su prikazani samo uzorci uzeti nakon 5, 80, 160, 180, 240, 480 i 1440 min, a navedeni su zastupljeni s 26, 9, 15, 7, 12, 17, odnosno 26 bioloških replika. Pokretljivost je potom provjeravana pregledom kratkih video isječaka koji su prikazivali različite periode pri temperaturama od 4 i 17°C. Spermatozoidi su kategorizirani kao brzopokretni, sporopokretni te općenito pokretni (brzopokretne jednike + sporopokretne jedinke), a brojani su u svakom videu posebno. Potom su za svaki uzorak izračunati postoci sporopokretnih, brzopokretnih i općenito pokretnih spermatozoida. Spermatozoidi koji su testirani pri 4°C skladišteni su u hladnjaku na temperaturi od 4°C, dok su oni testirani pri temperaturi od 17°C držani u prostoriji za mriješćenje na temperaturi prikladnoj za eksperiment.

3.7. Određivanje udjela samooplodenih jajnih stanica

Za svaku seriju ispuštenih jajnih stanica uzimani su uzorci volumena 10 ml, te su se sljedeći dan pod svjetlosnim mikroskopom brojale pokretne trohofore (samooplodene jedinke), kao i neoplodene jajne stanice, kako bi se konačno mogao izračunati udio (postotak) samooplodenih jajnih stanica u svakom uzorku. Od prve do šeste serije izbacivanja jajnih stanica dobivene su tri biološke replike (od tri odrasle jedinke), za sedmu dvije, a za osmu i devetu seriju samo jedna (stoga su se uzela dvije tehničke replike za svaki, tj. dva uzastopna uzorka od iste jedinke), te su pripadajući rezultati prikazani za svaku seriju izbacivanja posebno.

3.8. Umjetna oplodnja nizom različitih koncentracija spermatozoida

Nakon ispuštanja ovocita, najkvalitetnije serije uzoraka (s obzirom na što niži postotak samooplodenih jajnih stanica) razrijedene su morskom vodom, a potom oprezno miješane, te su uzimani uzorci za utvrđivanje koncentracije, odnosno ukupne količine jajnih stanica. Koncentracija se računala brojanjem ovocita unutar deset uzoraka od 50 µl za svaku seriju.

Nakon toga serije su oplođene spermom u odnosima od 5, 10, 20, 40, 100, 1000 i 10000 spermatozoida po ovocitu, te su posebni uzorci inkubirani u plastičnim bocama volumena 50 ml kako bi se utvrdio stupanj oplodnje (udio oplođenih u svakom uzorku). Oplodnja se provjeravala sljedeći dan brojanjem pokretnih trohofora unutar uzorka od 200 μl pod svjetlosnim mikroskopom. Potom su se računali postoci oplođenih u uzorcima po formuli:

broj pokretnih trohofora / (broj pokretnih trohofora + broj neoplođenih jajnih stanica).

S obzirom da je česta pojava da poneke jedinke tijekom mriješćenja ne ispuste jajne stanice, smatra se da su te jedinke bile nespremne za mriješćenje i bez obzira koliko ih tretirali temperaturnim šokom do ispuštanja ženskih spolnih stanica nije moglo doći (Sissel, usmeno priopćenje).

3.9. Praćenje deformacija ranih razvojnih stadija

Uzorci oplođenih jajnih stanica velike kapice *P. maximus* snimani su kamerom Canon 5D MARK II pričvršćenom na mikroskop Olympus BX60, kako bi se utvrdilo postojanje mogućih deformacija ranih razvojnih stadija.

3.10. Statistička obrada podataka

Za statističke analize korištena su dva programa: R i STATISTICA. R je besplatan programski sustav za statističku obradu i grafičku vizualizaciju podataka (<http://www.r-project.org/>), a u ovom radu korišten je za izradu grafičkih prikaza rezultata.

STATISTICA (StatSoft, Inc., 2012) je računalni program sa skupom funkcija za statističku obradu podataka, a dostupan je na stranici <http://www.statsoft.com/>. U radu je korištena verzija STATISTICA 10, uz pomoć koje je napravljen niz statističkih testova rezultata.

Vidljive razlike među skupovima uzoraka (dobiveni postoci opisani u prethodnim dijelovima poglavlja Materijal i metode) testirani su prikladnim statističkim testovima kako bi se odredilo da li su razlike između dva ili više uzoraka iste populacije uistinu značajne.

Ponajprije smo testirali da li svaki skup podataka ima normalnu raspodijelu ili ne, a u tu svrhu korišten je Shapiro-Wilkinsonov test (Shapiro i Wilk, 1965).

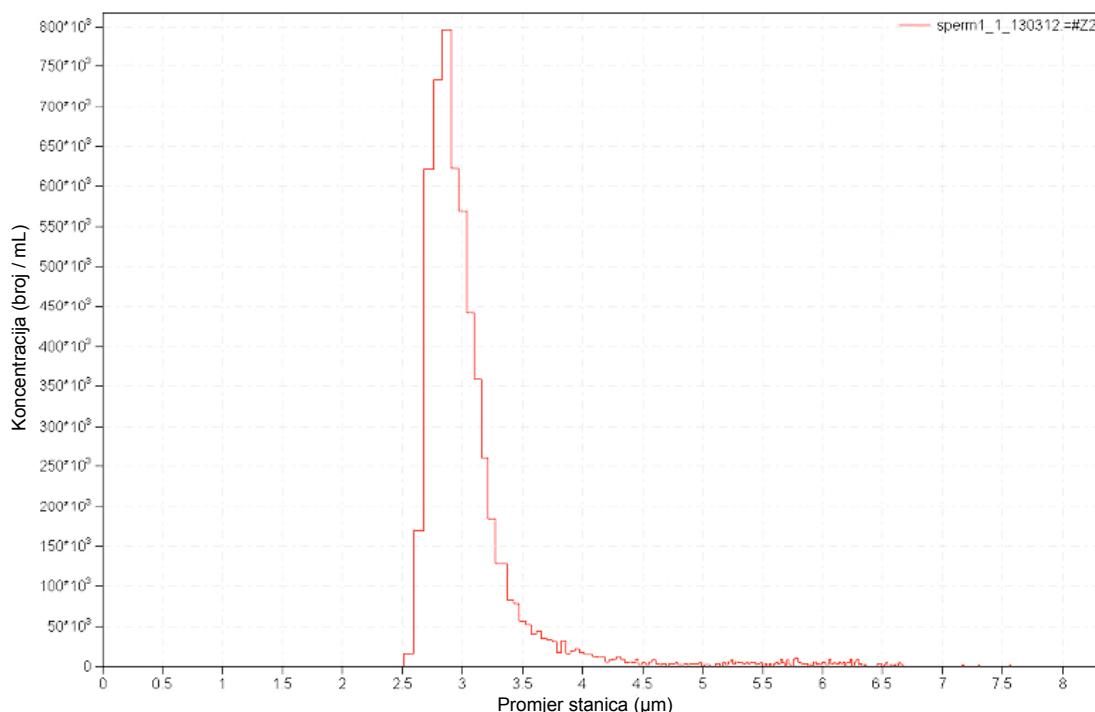
Za skupove podataka koji su pokazali normalnu raspodijelu koristio se potom parametarski test ANOVA za analizu varijance (Anscombe, 1948; Kruskal i Wallis, 1952), a za ostale neparametarski Kruskal-Wallisov test (Kruskal i Wallis, 1952). Skup podataka

koncentracije spermatozoida pokazao je normalnu raspodijelu, te se potom koristio jednosmjerni test ANOVA, dok su podaci udjela jajnih stanica oplođenih umjetnom oplodnjom i samooplodnjom testirani neparametarskim testom Kruskal-Wallis.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje koncentracije spermatozoida brojačem Coulter Z2

Primjer određivanja koncentracije spermatozoida velike kapice *P.maximus* uz pomoć brojača Coulter Z2 prikazan je na Slici 6. Rezultat mjerena ovim brojačem daje informaciju o koncentraciji stanica (ordinata) koje imaju određeni volumen, odnosno promjer (apcisa). Vidljiva je relativno oštra krivulja s maksimalnom vrijednošću od $3.12 \mu\text{m}$. Srednja vrijednost promjera stanica za koje je određena koncentracija u nizu od 17 mjerena (bioloških replika) jednaka je $3.22 \mu\text{m}$, uz standardnu devijaciju $0.81 \mu\text{m}$.

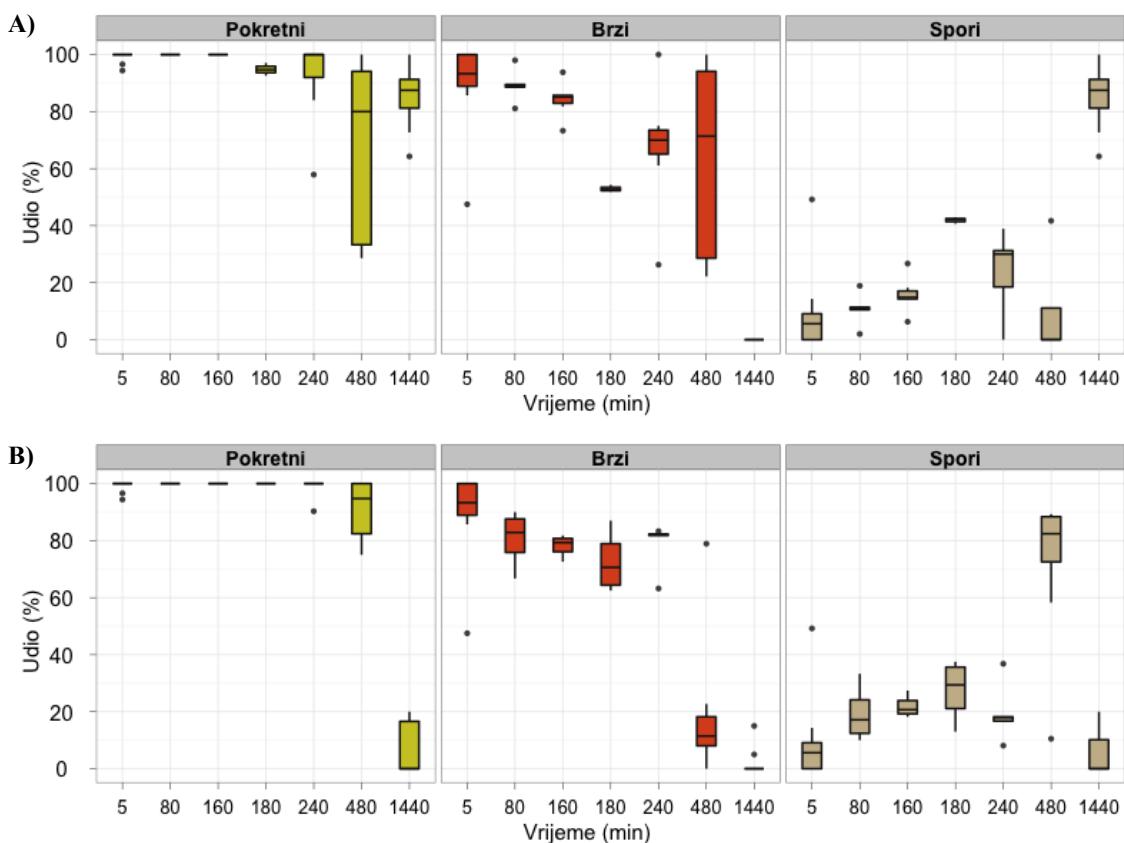


Slika 6. Očitavanje koncentracije stanica određenog promjera brojačem Coulter Z2.

4.2. Dinamika pokretljivosti spermatozoida

Dinamika pokretljivosti spermatozoida od pete do 1440. minute (24 h) po izbacivanju iz jedinki *P.maximus* pri dvije testirane temperature (4°C i 17°C) prikazana je udjelima brzopokretnih, sporopokretnih, te općenito pokretnih (sporopokretni + brzopokretni) spermatozoida na Slici 7. Udio pokretnih spermatozoida ostao je gotovo konstantan od 5. do 240. minute (četiri sata) pri obje temperature (Kruskal-Wallis test; p vrijednosti = 1). U 480-oj minuti (osam sati) udio se smanjuje pri temperaturi od 4°C (Slika 7A; Kruskal-Wallis test; p

vrijednosti < 0.023), dok nema značajnog pada pri 17°C , no to je zbog toga što tada većinu pokretne populacije spermatozoida čine sporopokretni spermatozoidi (Slika 7B). Stoga su uočljive razlike u udjelu brzopokretnih spermatozoida nakon osam sati između dvije testirane temperature: dok nema statistički značajne razlike kod spermatozoida pohranjenih na 4°C (Kruskal-Wallis test; p vrijednost > 0.94), vidljiv je pad udjela brzopokretnih spermatozoida pri 17°C (Kruskal-Wallis test; p vrijednost < 0.000353). U zadnjem vremenskom intervalu ($480 - 1440$ min) velika većina spermatozoida postaje nepokretna pri temperaturi od 17°C (zbog toga što je do tada velika većina spermatozoida mrtva; Kruskal-Wallis test; p vrijednost < 0.000351), dok pri 4°C većina spermatozoida ostaje pokretna, iako tu populaciju tad sačinjavaju sporopokretne jedinke (Kruskal-Wallis test; p vrijednost < 0.000001).

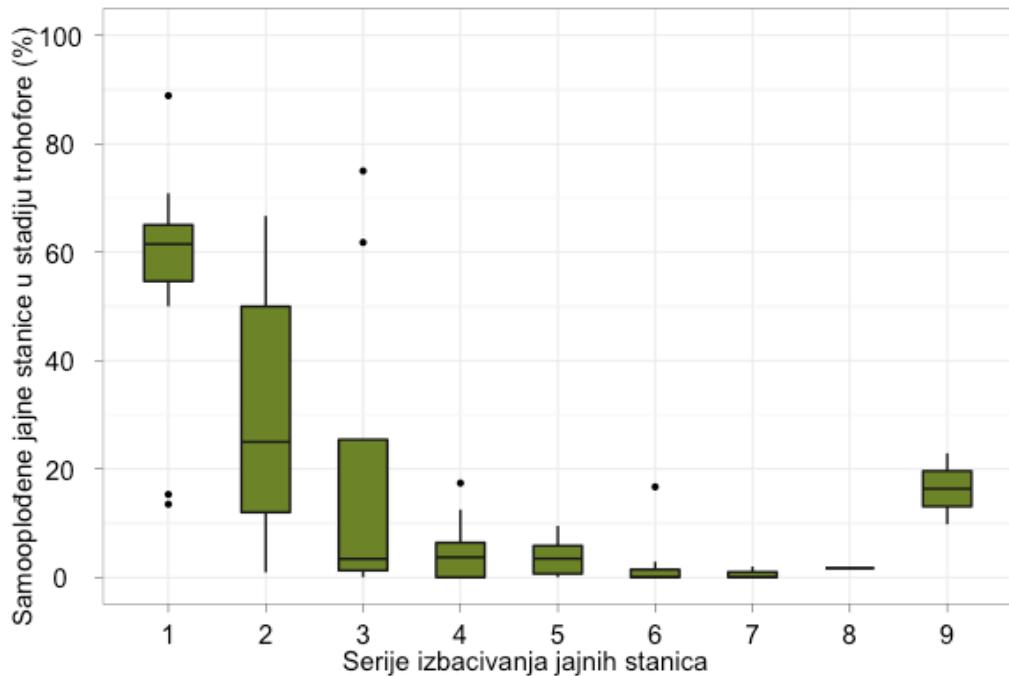


Slika 7. Pokretljivost brzopokretnih, sporopokretnih i općenito pokretnih (sporopokretni + brzopokretni) spermatozoida pri temperaturi od 4°C (A) i 17°C (B).

4.3. Stupanj samooplodnje u različitim serijama izbacivanja jajnih stanica

Početna izbacivanja jajnih stanica jedinki *P. maximus* pokazala su relativno visoki postotak samooplođenih jajnih stanica u usporedbi s ostalima (Slika 8). Najviši postotak, i to uz relativno male varijacije među testiranim uzorcima pokazuje upravo prvo izbacivanje, te

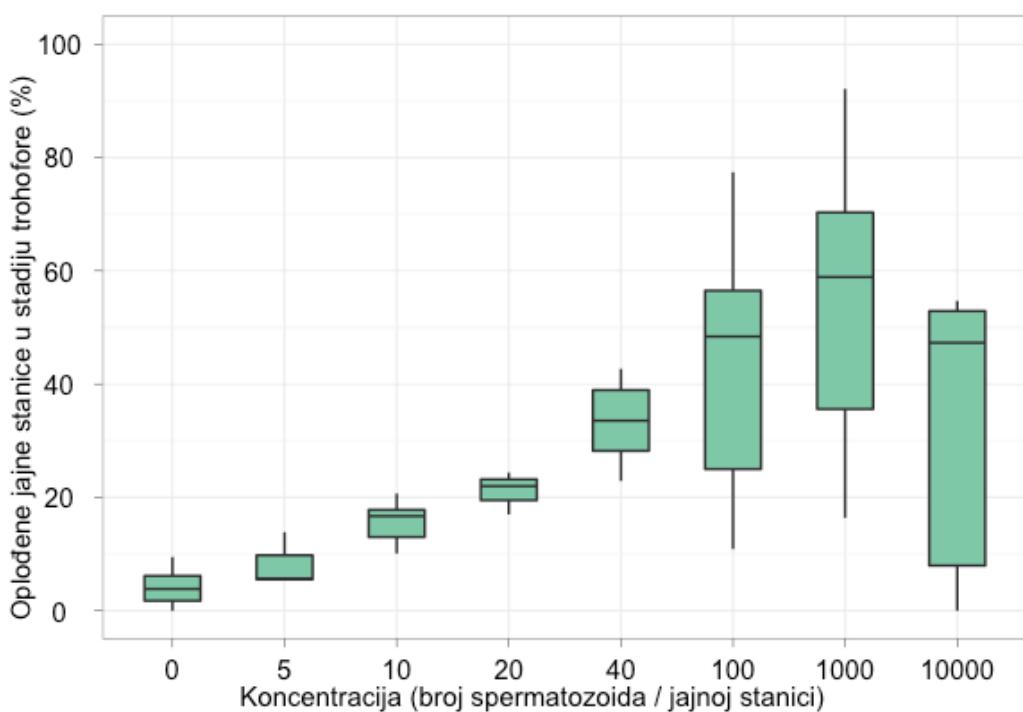
ostaje prisutno u nižim udjelima sve do trećeg izbacivanja, nakon čega udio samooplođenih jajnih stanica ostaje veoma malen (osim devete serije) (Kruskal-Wallis test; p vrijednost < 0.0316), i to uz male varijacije među uzorcima. Druga serija izbacivanja (a donekle i treća), iako uz manje udjele samooplodnje, pokazuje relativno velike varijacije među uzorcima.



Slika 8. Postotak samooplođenih jajnih stanica (u stadiju trohofore) u različitim serijama njihova izbacivanja iz jedinki *P.maximus*.

4.4. Utjecaj koncentracije spermatozoida na uspješnost umjetne oplodnje

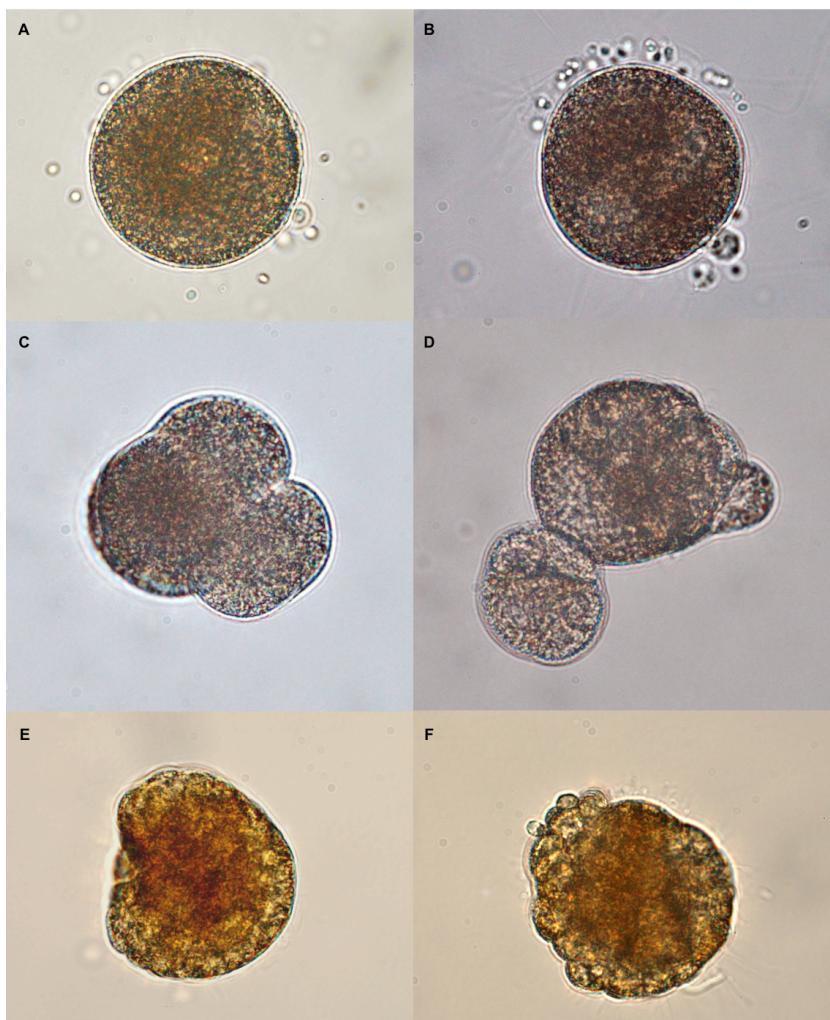
S porastom koncentracije spermatozoida rastao je i udio oplođenih jajnih stanica, a značajan skok vrijednosti dogodio se kod koncentracije od 40 spermatozoida po jajnoj stanici (ANOVA test; p vrijednosti < 0.0187), nakon čega se može vidjeti daljnji rast, ali uz velike varijacije među uzorcima, i stoga bez statističke značajnosti (ANOVA test; p vrijednost > 0.68) (Slika 9). Vrlo visoka koncentracija spermatozoida (10000 jedinki po jajnoj stanici) rezultirala je padom postotka oplođenih jajnih stanica koje su dosegle razvojni stadij trohofore (no ponovno uz velike varijacije), najvjerojatnije zbog fenomena polispermije. Očit je također i nagli porast vrijednosti (medijana) postotaka međuoplodnje između uzoraka oplođenih koncentracijama spermatozoida 40 i 100 jedinki po jajnoj stanici, a znatno manji rast prisutan je kod usporedbe postotaka oplođenih stanica koncentracijama od 100 i 1000 spermatozoida po jajnoj stanici (Slika 9).



Slika 9. Postotak oplodjenih jajnih stanica (u stadiju trohofore) za različite koncentracije spermatozoida prilikom međuoplodnje.

4.5. Deformacije ranih razvojnih stadija velike kapice *P.maximus*

Pri oplodnji jajnih stanica koncentracijama spermatozoida već od 100 jedinki/ovocit, a posebice višim koncentracijama (1000, a najznačajnije od ispitivanih onoј od 10000 spermatozoida po jajnoj stanici), očigledne su deformacije već u stadiju blastule (Slika 10). Deformacije uzrokovane nekontroliranim diobama stanica rezultiraju abnormalnim morfološkim oblicima, od kojih neke vidimo u priloženoj Slici 10.



Slika 10. Deformacije razvojnih stadija oplodenih jajnih stanica zbog fenomena polispermije. A) Normalna jajna stanica okružena s normalnim brojem spermatozoida, B) Jajna stanica okružena s brojim spermatozoidaima, C) Normalna dioba embrija u stadiju blastule, D) Abnormalni embryo u stadiju blastule, E) Normalan embryo u stadiju gastrule, F) Abnormalni embryo u stadiju gastrule.

5. RASPRAVA

Unatoč dosadašnjim naporima da se unaprijedi protokol mriješćenja velike kapice *Pecten maximus* i dalje su prisutni veliki gubici u mrjestištima, dijelom zbog nedovoljno ispitanih čimbenika koji utječu na uzgoj, ali i uslijed velikih razlika i/ili neslaganja zaključaka niza ispitivanja u različitim laboratorijima. Cilj ovog rada bio je dobiti bolji uvid u proces mriješćenja u kontroliranim uvjetima mrjestilišta, te pomnije ispitati neke od čimbenika koji imaju velik utjecaj na uspješnot oplodnje, kao i daljnji razvoj oplođenih jedinki. Na temelju boljeg razumijevanja čimbenika koji utječu na mriješćenje i stopu rasta ličinki, odnosno točno i precizno određivanje raspona vrijednosti koji oni mogu poprimiti, moguće je unaprijediti protokol mriješćenja u kontroliranim uvjetima. To bi rezultiralo uspješnijim uzgojem ove vrste, a time i većom komercijalizacijom mrijestilišta.

5.1. Metoda određivanja koncentracije spermatozoida velike kapice *P. maximus*

Koncentracija spermatozoida kojom se provodi umjetna oplodnja jajnih stanica u mrijestilištu iznimno je važan čimbenik, a samim time važno je i što točnije odrediti samu koncentraciju. Često korištena metoda određivanja koncentracije uz pomoć hemocitometra uključuje brojanje spermatozoida oko jedne ili nekoliko nasumičnih jajnih stanica u uzorku, pokazala se vrlo nepraktičnom, između ostalog zbog presudnog ljudskog faktora, a time i sporosti kao i vrlo vjerljivne netočnosti metode. Nadalje, uziman je veoma mali uzorak kako bi se pod svjetlosnim mikroskopom prebrojali spermatozoidi oko jajne stanice, i to u dvodimenzionalnoj slici, a jasno je dakako da se spermatozoidi mogu nalaziti i ispod jajne stanice i time biti oku nevidljivi. Iako je pod svjetlosnim mikroskopom moguće mijenjati fokus i dvodimenzionalnu plohu, ovim načinom dobivane su prilično velike varijacije u broju spermatozoida oko različitih jajnih stanica u istom uzorku budući da distribucija spermatozoida može znatno varirati od ovocita do ovocita, kao što se i brojni spermatozoidi nalaze u okolnom mediju, te još nisu pronašli jajnu stanicu. Stoga je odlučeno koristiti novu metodu određivanja koncentracije spermatozoida vrste *P. maximus* kojom bi bilo moguće u što većoj mjeri zaobići ljudski utjecaj, povećati uzorak na kojem se određuje koncentracija u jednom mjerenuju, odnosno «protočnost» metode, čime bi i krajnji rezultat bio precizniji. Rabljen je brojač stanica Coulter Z2, kojim je moguće namjestiti veličinu čestica koje se broje u uzorku, te se kao rezultat dobije koncentracija čestica koje su u uzorku imale određeni promjer (veličinu). Iako se brojač dosada koristio većinom za jednostanične alge, pretpostavka je bila da će biti prikladan i za brojanje spermatozoida zbog usporedive veličine

čestica (promjer glave spermatozoida je približno $3.5 \mu\text{m}$) te činjenice da je sam rep spermatozoida vrlo tanak zbog čega ga najvjerojatnije brojač nije detektirao, tj. brojao odvojeno glavu i rep spermatozoida. Vidljivo je to i iz primjera krivulje očitanja koncentracije spermatozoida koja ima samo jedan relativno oštar vrh s vrijednošću koja odgovara veličini spermatozoida. Prigodom mjerena brojale su se samo čestice zadane veličine (od $2.5 \mu\text{m}$ - $8 \mu\text{m}$), te se većina stanica koje su zabilježene brojačem nalaze oko vrijednosti karakterističnih za spermatozoide ove vrste školjkaša. Donja granica veličine bitna je kako bi se eliminiralo brojanje bakterija i ostalih sitnih čestica koje nisu bitne za eksperiment.

Ova metoda stoga omogućuje standardizaciju protokola za određivanje koncentracije jer smanjuje ljudski utjecaj na minimum, pa ju je moguće lakše replicirati u različitim laboratorijima. Dakako, metoda vjerojatno omogućuje i točnija mjerena koncentracije spermatozoida ove vrste, ne samo zbog naprednije tehnologije brojanja stanica uz pomoć brojača, već i zbog toga što se samo mjerjenje obavlja na većim uzorcima (bez ljudskog brojanja), ne fokusirajući se pritom samo na dvodimenzionalne slike pojedinačnih jajnih stanica, što povećava statističku značajnost rezultata.

5.2. Utjecaj pokretljivosti spermatozoida na uspjeh oplodnje

Poznato je da je vijabilnost spermatozoida ključan čimbenik za uspješnu oplodnju u kontroliranim uvjetima, ali i da opada u jedinici vremena, stoga je neophodno odrediti vremenski raspon u kojem spermatozoidi ostaju dovoljno pokretni pri određenoj temperaturi. Svakako jedna od najočitijih naznaka vijabilnosti spermatozoida je njihova pokretljivost, stoga se nastojalo odrediti u kojoj mjeri spermatozoidi ostaju pokretni u razdoblju od 24h. Iako postoji niz preciznijih tehnika kojima se može odrediti vijabilnost spermatozoida, uključujući mjerjenje respiracije (Faure i sur., 1994) i sl., u ovom radu nije bilo potrebno precizno kvantificirati neki od čimbenika vijabilnosti spermatozoida kao što je respiracija, već postaviti vremenske okvire unutar kojih su spermatozoidi iskoristivi za kontroliranu oplodnju, pritom vodeći računa o dvije vrijednosti temperature kojima se obično izlažu spermatozoidi: temperatura hladnjaka (4°C) i temperatura u prostoriji za mriještenje (17°C). Stoga je izabrana metoda brojanja pokretnih spermatozoida pod svjetlosnim mikroskopom kao što je već prethodno opisano. Prigodom ispuštanja spolnih stanica temperaturnim šokom, često se događalo da jedinke prvo ispuste dovoljnu količinu spermatozoida, koji su skladišteni do sakupljanja dovoljne količine kvalitetnih jajnih stanica potrebnih za kontroliranu oplodnju. Upravo iz tih razloga bilo je potrebno ispitati da li je prihvatljivo skladištiti dobivene

spermatozoide u hladnjaku pri 4°C i koliko dugo (s obzirom na na trajanje procesa mriješćenja), te kako to utječe na pokretljivost spermatozoida. Kao što je bilo očekivano, skladištenje spermatozoida pri 4°C nije značajno utjecalo na pokretljivost spermatozoida (općenito pokretni i brzopokretni) u vremenskom periodu od pete do 240-te min (četiri sata) (p vrijednost > 0.05), no vidljiv je značajan pad pokretljivosti nakon tog razdoblja (u 480-oj minuti; p vrijednost < 0.02). Stoga se može zaključiti da je poželjno iskoristiti dobivene spermatozoide unutar maksimalno četiri sata ukoliko se drže na 4°C . Ono što je također moguće napraviti kako bi se produljio vijek pokretnih spermatozoida je snižavanje pH vrijednosti medija u kojem se drže (Faure i sur., 1994). Naime, dokazano je da povećanje pH vrijednosti medija služi kao okidač pokretljivosti spermatozoida, pa nakon njihovog napuštanja roditeljske jedinke (pH približno 6.5) u morsku vodu (koja ima pH približno 7.5) dolazi do naglog povećanja potrošnje kisika (respiracije) na staničnoj razini, a samim time i do povećanja pokretljivosti spermatozoida. S druge strane, izbacivanje spermatozoida u medij pH vrijednosti približno 5 dovodi do njihove inaktivacije, usporenog kretanja i metabolizma (Faure i sur., 1994). Uzorci sperme koji su korišteni za promatranje pokretljivosti tijekom mriješćenja su ispuštani u morsku vodu te su skladišteni u istoj, stoga je vidljivo da je okidač za ubrzenu respiraciju već pokrenut, te da se vjerojatno moglo bolje očuvati spermu smanjenjem pH vrijednosti morske vode na na 5-6.5. Time bi se usporila potrošnju kisika i očuvalo spermatozoide u boljem stanju duže vremena.

5.3. Samooplodonja velike kapice *P.maximus* prigodom mriješćenja u kontroliranim uvjetima

Samooplodnju hermafrodita *P.maximus* praktički je nemoguće zaustaviti zbog ostataka sperme u gonoduktu, koja se zalijepi na jajne stanice prilikom izbacivanja. Usprkos tome, jedinke izbacuju jajne stanice u više navrata, tzv. serija izbacivanja, koje obično sadrže i različite udjele samooplodenih stanica. Prvo izbacivanje jajnih stanica uvijek ima visok udio samooplodenih jajnih stanica, dok iduće tri serije imaju manji udio samooplodenih jajnih stanica te su pogodne za umjetnu oplodnju (Andersen i sur., 2011). Zbog toga je na postotak samooplodnje testirana svaka serija jedinki koje su izbacivale ovocite, kako bi se odredile serije sa što nižim udjelom samooplodenih jajnih stanica. Prethodno su se odbacivale samo prve i zadnje serije; prva zbog visoke samooplodnje (Beaumont i Budd, 1983), dok zadnja zbog nekvalitetnih jaja (Andersen, usmeno priopćenje). Rezultati ovog rada pokazuju da se trebaju odbaciti barem prve dvije serije jajnih stanica kako bi se smanjio još uvijek značajan

stupanj samooplodnje kod uzgajanih organizama. Dakle, iako je vrijednost medijana udjela samooplođenih iz niza uzoraka izbacivanja jajnih stanica (različitih jedinki) relativno niska, i dalje su prisutne velike varijacije među uzorcima, te se lako može dogoditi da prilično visok udio samooplođenih ostane u uzorcima koji se koriste za umjetnu oplodnju. Kod samo jedne jedinke zabilježeno je devet serija izbacivanja jajnih stanica, te je upravo kod posljednje došlo do povećane samooplodnje. Razlog ovoj pojavi bi mogla biti ili ljudska pogreška (došlo je do oplodnje jer je susjedna jedinka - u susjednoj posudi, prilikom ispuštanja spermatozoida zapljušnula posudu s jajima prve jedinke koja je stajala preblizu), ili zbog curenja sperme u gonodukt kao rezultat pripreme jedinke za ponovno ispuštanje spermatozoida (te je ponovno došlo do samooplodnje). Usprkos tome udio samooplodnje opada od prve k narednim serijama izbacivanja jajnih stanica, te je deveta serija vrlo rijetka među testiranim jedinkama i u ovom slučaju njen visok udio samooplodnje najvjerojatnije uzrokovao pogreškom prigodom procesa mriješćenja.

Posljedica samooplodnje uglavnom su spororastuće ličinke koje karakterizira slabo razvijeni velum, odgovoran za pokretanje i hranjenje jedinke, pa zbog slabije pokretljivosti jedinke teže „hvataju“ čestice iz vodenog stupca (Strathmann, 1979). Samooplođene jedinke velike kapice *P. maximus* sporije rastu od jedinki koje su dobivene umjetnom oplodnjom (Beaumont i Budd, 1983), stoga se prigodom komercijalnog uzgoja ove vrste pokušava izbjegći samooplodnja. Općenito bi se za porodicu Pectenidae moglo reći da samooplođene jedinke u većini slučajeva imaju sporiji rast, pokazuju brojne deformacije i veći mortalitet. Za vrstu *Argopecten irradians* utvrđeno je da nema razlike između samooplođenih jedinki i onih dobivenih umjetnom oplodnjom (Wilbur i Gaffney, 1991), dok druga istraživanja ukazuju na usporen rast i veći mortalitet (Choromanski i Stiles, 1995; Liu i sur., 2011). Slični podaci dobiveni su i kod vrste *Argopecten circularis* koji pokazuju da samooplođene jedinke u odnosu na one dobivene umjetnom oplodnjom imaju usporen rast i veći mortalitet (Ibarrah i sur., 1995). Za češljaču *Argopecten purpuratus* također postoje različiti podaci: od onih koji tvrde da nema razlike u brzini rasta i preživljavanju (Winkler i Estévez, 2003), dok drugi ukazuju na značajne razlike u brzini rasta i preživljavanju između samooplođenih i umjetno oplodjenih jedinki (Martinez i sur., 2007). Slične pojave zabilježene su i kod nekih drugih vrsta, primjerice kod mediteranske dagnje *M. galloprovincialis*, koja je odvojenog spola te se ponekad dogodi da jedinka posjeduje muške i ženske gonade, a to rezultira samooplođenim jedinkama koje imaju usporen rast, visoku stopu mortaliteta, kao i brojne deformacije uzrokovane samanjenim brojem alela (Beaumont i Matin-Abdul, 1994).

Usprkos pojedinim naznakama da samooplođene jedinke ne pokazuju usporen rast i niži mortalitet u odnosu na one dobivene umjetnom oplodnjom, u mnogim slučajevima je pokazano upravo suprotno. Zbog ovakvih kontradiktornih zaključaka niza različitih istraživanja, a s obzirom da su i brzina rasta jedinki i mortalitet vrlo bitne stavke u komercijalnom uzgoju bilo koje vrste, preporučljivo je izbjegavati samooplodnju prigodom uzgoja velike kapice *P. maximus*. Prema podacima koji nisu prikazani u radu samooplodnja ne uzrokuje deformacije koje su vidljive samom oku ili koje uvelike utječu na preživljavanje jedinki, već kao rezultat također imamo jedinke koje sporije rastu.

5.4. Međusobna ovisnost koncentracije spermatozoida, uspješnosti umjetne oplodnje i polispermije

Dosadašnja praksa u komercijalnim mrjestilištima prigodom umjetne oplodnje *P. maximus* temeljila se na odnosu od najviše 10 spermatozoida po jajnoj stanici kako bi se izbjegla polispermija i ostvario što veći postotak oplođenih jajnih stanica (Andersen, usmeno priopćenje). Razlog tome su dosadašnja istraživanja (Gruffydd i Beaumont, 1972; Devauchelle i Mingant, 1991) koja su pokazala da se koncentracija od 10 spermatozoida po jajnoj stanici, odnosno jedan do pet spermatozoida po jajnoj stanici pokazala kao najbolji odnos za uspješnu umjetnu oplodnju. Za razliku od navedenog, Gruffydd i Beaumont (1970) došli su do zaključka da je koncentracija spermatozoida od 1- 100 spermatozoida po jajnoj stanici najbolja za umjetnu oplodnju. Sve navedeno pokazuje da podaci dobiveni metodom brojanja spermatozoida oko jajne stanice iznimno variraju, te da su vrlo neprecizni zbog mogućnosti ljudske pogreške, kao i zbog različite disperzije spermatozoida unutar medija s jajnim stanicama, što uvelike utječe na brojanje spermatozoida. Rezultati rada pokazuju da udio oplođenih jajnih stanica raste sve do koncentracije od 1000 spermatozoida po jajnoj stanici, dok je pri znatno višoj koncentraciji od 10000 spermatozoida vidljiv pad u udjelu oplođenih jajnih stanica koje su dosegle razvojni stadij trohofore. Uzrok padu je fenomen polispermije, koja se definira kao stanje u kojem više spermatozoida penetrira kroz membranu jajne stanice, te kao posljedicu ima kaotčnu diobu stanica koja kod brojnih vrsta rezultira smrću embrija (Togo i Morisawa, 1999; Frank, 2000). Polispermija je promatrana kod brojnih školjkaša s vanjskom oplodnjom kao što su vrste *P. maximus* (Beaumont i Budd, 1983), *M. galloprovincialis* (Dufresne-Dubé i sur., 1983), *Crasostrea virginica* (Alliegro i Wright, 1983), *Spisula solidissima* (Clotteau i Dubé, 1993), *Dreissena polymorpha* (Misamore i sur., 1996), *Macoma balthica* (Luttkhuizen i Pijnacker, 2002) i *Tegillarca granosa* (Dong i sur.,

2012). Brojna istraživanja ukazuju na postojanje veze između koncentracije spermatozoida po jajnoj stanici i polispermije (Beaumont i Budd, 1983; Togo i sur., 1995; Levitan i sur., 2007; Dong i sur., 2012). Povećana koncentracija spermatozoida uzrokuje veći postotak polispermije u odnosu na normalno oplđene jajne stanice, ali isto tako pri višim koncentracijama dolazi do «jače» polispermije tj. u istu jajnu stanicu prodre više od 2 spermatozoida (maksimalan zamijećen broj spermatozoida je 12) (Luttikhuizen i Pijnacker, 2002; Dong i sur., 2012). Broj i smrtnost abnormalnih embrija raste s povećanom koncentracijom spermatozoida, odnosno s veličinom polispermije. Jajne stanice u koje je prodrlo više od dva spermatozoida prolaze kroz kaotičnu diobu stanica te uspjevaju preživjeti do abnormalnog stadja trohofore, ali rijetko do D stadija ličinke (Dong i sur., 2012).

Pri koncentraciji od 1000 spermatozoida po jajnoj stanici uspješnost oplodnje je porasla, ali nije bilo normalnih stadija gastrula ili trohofora u uzorcima, što znači da je koncentracija spermatozoida bila toliko visoka da je većina jajnih stanica oplođena polispermijom. Pri koncentraciji od 10000 spermatozoida po jajnoj stanici uspješnost oplodnje opada te u uzorku pronalazimo rijetke preživjele embrije, s vidljivim naznakama deformacija, kao i brojne ostatke uginulih embrija koji se zbog sveopće polispermije uopće nisu uspjeli razviti do pokretnog stadija gastrule. Uvezvi u obzir navedene posljedice polispermije, vidljive već i kod koncentracija od 100 spermatozoida po jajnoj stanici (podaci nisu prikazani), zaključak je da se optimalna koncentracija za međuoplodnju kreće oko 40 spermatozoida po jajnoj stanici, ta da bi trebalo pobliže istražiti koncentracije od 40 – 100 spermatozoida po jajnoj stanici. Naime, pri koncentraciji od 40 spermatozoida postotak plivajućih stadija u uzorcima je oko 35%, te nije zamijećena prisutnost polispermije, dok kod koncentracije od 100 spermatozoida po jajnoj stanici medjan udjela oplodenih jajnih stanica niza uzoraka se nalazi na 51.5%, ali je postotak polispermije velik. Iz ovoga je vidljivo da se optimalna koncentracija za uspješnu oplodnju nalazi negdje između 40 i 100 spermatozoida po jajnoj stanici te bi je stoga u dalnjim istraživanjima trebalo preciznije utvrditi. Time bi se dodatno unaprijedio protokol mriješćenja velike kapice *P. Maximus* u kontroliranim uvjetima mrjestilišta. Uz polispermiju, moguća loša kvaliteta jajnih stanica također može utjecati na abnormalan razvoj embrija. Jajne stanice lošije kvalitete zahtjevaju veće koncentracije spermatozoida za oplodnju i ujedno daju manji postotak uspješno razvijenih ličinki (Marshall i sur., 2002).

ZAKLJUČCI

- ❖ Metoda mjerena koncentracije spermatozoida velike kapice *P. maximus* brojačem Coulter Z2, opisana u ovom radu, omogućuje preciznije i pouzdanije mjerjenje od dosadašnjih metoda zbog naprednije tehnologije mjerjenja, uvelike smanjenog utjecaja ljudske pogreške pri mjerenu, kao i mjerjenje na znatno većim uzorcima. Stoga ova metoda može omogućiti standardizaciju mjerjenja i time olakšati usporedbu rezultata dobijenih u različitim laboratorijima.
- ❖ Dinamika pokretljivosti spermatozoida u vremenskim intervalima unutar 24 h od njihova inducirano izbacivanja pokazala je da spermatozoidi ostaju u velikoj mjeri pokretni (i time vjerojatno iskoristivi za kontrolirano mriještenje) unutar prva četiri sata pri obje ispitivane temperature (4°C i 17°C). Pokretljivost spermatozoida znatno opada nakon osam sati ukoliko se skladište na 17°C , dok je pri 4°C pokretljivost očuvana u manjoj mjeri čak i nakon 24 h. Zbog toga je skladištenje pri 4°C prikladnije jer spermatozoidi ostaju duže pokretni.
- ❖ Stupanj samooplodnje značajno varira između niza induciranih izbacivanja (serija) jajnih stanica. Prema dobivenim rezultatima, prve tri serije sadrže (pre)visoki udio samooplođenih jajnih stanica, koji također značajno varira između pripadnih uzoraka. To čini prve tri serije izbacivanja jajnih stanica nepouzdanim i nepodobnim za mriještenje u kontroliranim uvjetima, ukoliko se nastoji izbjegći samooplodnja koja često rezultira spororastućim jedinkama.
- ❖ S porastom koncentracije spermatozoida do 1000 komada po jajnoj stanici, broj oplođenih jajnih stanica prigodom mriještenja u kontroliranim uvjetima značajno se povećava, ali se naglo povećava i učestalost polispermije uzrokujući nepravilnu diobu stanica i u konačnici vidljive deformacije ranih razvojnih stadija, zbog kojih takve jedinke rijetko dosegnu stadij D ličinke. S obzirom da je pojavnost polispermije vidljiva već kod koncentracija od 100 spermatozoida po jajnoj stanici, te da je značajan porast normalno oplođenih jajnih stanica vidljiv pri koncentraciji od 40 spermatozoida po stanici (u odnosu na manje koncentracije), optimalna koncentracija spermatozoida za umjetnu oplodnju nalazi se između te dvije vrijednosti. Za njezino su precizno određivanje potrebna daljnja istraživanja.

7. LITERATURA

- Acosta, C.P., Roman, G., 1994. Growth and reproduction in a southern population of scallop *Pecten maximus*. In: Proceedings of the 9th International Pectinid Workshop, (Nanaimo, B.C., Canada), str. 119–126.
- Alliegro, M.C., Wright, D.A., 1983. Polyspermy inhibition in the oyster, *Crassostrea virginica*. Journal of Experimental Zoology 227, 127–137.
- Andersen, S., Christophersen, G., Magnesen, T., 2011. Spat production of the great scallop (*Pecten maximus*): a roller coaster. Canadian Journal of Zoology 89, 579–598.
- Andersen, S., Ringvold, H., 2000. Seasonal differences in effect of broodstock diet on spawning success in the great scallop. Aquaculture International 8, 259–265.
- Anscombe, F.J., 1948. The Validity of Comparative Experiments. Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General) III, 181.
- Ansell, A.D., Dao, J.-C., Mason, J., 1991. Three European scallops: *Pecten maximus*, *Chlamys(Aequipecten)* operations and *C. (Chlamys) varia*. In: Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture., (Amsterdam: Elsevier), str. 715–751.
- Beaumont, A.R., Budd, M.D., 1983. Effects of self-fertilisation and other factors on the early development of the scallop *Pecten maximus*. Marine Biology 76, 285–289.
- Beaumont, A.R., Matin-Abdul, A.K.M., 1994. Differences in morphology, survival and size between self- and cross-fertilized larvae of *Mytilus galloprovincialis*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 74, 445–448.
- Bergh, Ø., Strand, Ø., 2001. Great scallop, *Pecten maximus*, research and culture strategies in Norway: a review. Aquaculture International 9, 305–317.
- Boucher, J., Dao, J.C., 1989. Repeuplement et forçage du recrutement de la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*). In: L'Homme Et Les Ressources Halieutiques. Essai Sur l'Usage D'une Ressource Commune Renouvelable, (France), str. 312–359.

- Bourne, N., 2000. The potential for scallop culture – the next millenium. *Aquaculture International* 8, 113–122.
- Bricelj, V.M., Shumway, S., 1991. Physiology: Energy acquisition and utilization. In *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture.*, (Amsterdam: Elsevier), str. 305–376.
- Campbell, D.A., Kelly, M.S., Busman, M., Bolch, C.J., Wiggins, E., Moeller, P.D.R., Morton, S.L., Hess, P., Shumway, S.E., 2001. Amnesic shellfish poisoning in the king scallop, *Pecten maximus*, from the west coast of Scotland. *Shellfish Res.* 20, 75–84.
- Cano, J., Garcia, T., 1985. Scallop fishery in the coast of Malaga. (La Coruna), str. 8.
- Casse, N., 1995. Eléments d'embryologie de *Pecten maximus* (mollusque, bivalve) = Embryonic development of pecten maximus (L.) (bivalve, mollusc). Text. Université de Bretagne Occidentale.
- Choromanski, J., Stiles, S., 1995. Observations on self-fertilization in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Journal of Shellfish Research* 14, 240.
- Clotteau, G., Dubé, F., 1993. Optimization of fertilization parameters for rearing surf clams (*Spisula solidissima*). *Aquaculture* 114, 339–353.
- Comely, C.A., 1972. Larval Culture of the Scallop *Pecten Maximus* (L). *J. Cons. Int. Explor. Mer* 34, 365–378.
- Cragg, S.M., Crisp, D.J., 1991. The biology of scallop larvae. In *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture.*, (New York: Elsevier), str. 75–132.
- Dao, J.-C., Fleury, P.-G., Barret, J., 1999. Scallop Sea Bed Culture in Europe. Stock Enhancement and Sea Ranching, 423–436.
- Devauchelle, N., Mingant, C., 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquatic Living Resources* 4, 41–51.
- Dong, Y., Yao, H., Lin, Z., Zhu, D., 2012. The effects of sperm–egg ratios on polyspermy in the blood clam, *Tegillarca granosa*. *Aquaculture Research* 43, 44–52.

Dufresne-Dubé, L., Dubé, F., Guerrier, P., Couillard, P., 1983. Absence of a complete block to polyspermy after fertilization of *Mytilus galloprovincialis* (mollusca, pelecypoda) oocytes. *Dev. Biol.* *97*, 27–33.

FAO, 2010. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. (Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)).

Faure, C., Devauchelle, N., Girard, J.-P., 1994. Ionic factors affecting motility, respiration and fertilization rate of the sperm of the bivalve *Pecten maximus* (L.). *Journal of Comparative Physiology B* *164*, 444–450.

Forbes, E., Hanley, S., 2007. A History Of British Mollusca And Their Shells (Kessinger Publishing, LLC).

Frank, S.A., 2000. Sperm competition and female avoidance of polyspermy mediated by sperm-egg biochemistry. *Evolutionary Ecology Research* *2*, 613–625.

Gavrilović, A., Jug Dujaković, J., Ljubičić, A., Conides, A., 2010a. Broodstock conditioning and induced spawning of the warty venus *Venus verrucosa* under four different feeding regimes. Proceedings and plenary session, WAS conference: Profitable and sustainable aquaculture. San Diego, 1-5. March.

Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Ljubičić, A., 2010. The effect of temperature on the growth, development and survival of larval and post larval stages of the European flat oyster, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758). 45th Croatian & 5th International Symposium on Agriculture. Proceedings and plenary session / Pospišil, Milan (ed.), Opatija, 15-18. February 2010.

Gruffydd, L.D., Beaumont, A.R., 1972. A method for rearing *Pecten maximus* larvae in the laboratory. *Marine Biology* *15*, 350–355.

Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. (Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Ibarra, A.M., Cruz, P., Romero, B.A., 1995. Effects of inbreeding on growth and survival of self-fertilized catarina scallop larvae, *Argopecten circularis*. *Aquaculture* *134*, 37–47.

Jug Dujaković, J., Gavrilović, A., Ljubičić, A., Conides, A., 2010a. The use of the diatom *Cylindrotheca closterium* in the feeding of *Ostrea edulis* larvae. Proceedings and plenary session, WAS conference: Profitable and sustainable aquaculture. San Diego, 1-5. March.

Jug-Dujaković, J., Gavrilović, A., Ljubičić, A. 2010b. Culture and comparison of growth and survival of oyster larvae, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), in various culture systems/. 45th Croatian & 5th International Symposium on Agriculture. Proceedings : plenary sessions / Pospišil, Milan (ed.), Opatija, 15-18. February 2010.

Kruskal, W.H., Wallis, W.A., 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. Journal of the American Statistical Association 47, 583.

Levitán, D.R., TerHorst, C.P., Fogarty, N.D., 2007. The risk of polyspermy in three congeneric sea urchins and its implications for gametic incompatibility and reproductive isolation. Evolution 61, 2007–2014.

Liu, H., Kelly, M.S., Campbell, D.A., Dong, S.L., Zhu, J.X., Wang, S.F., 2007. Exposure to domoic acid affects larval development of king scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). Aquat. Toxicol. 81, 152–158.

Liu, H., Kelly, M.S., Campbell, D.A., Fang, J., Zhu, J., 2008. Accumulation of domoic acid and its effect on juvenile king scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). Aquaculture 284, 224–230.

Liu, J., Liu, Z., Sun, X., 2011. The Effects of Inbreeding on Production Traits of the Southern Bay Scallop *Argopecten irradians concentricus*. Journal of Shellfish Research 30, 109–113.

Luttikhuizen, P.C., Pijnacker, L.P., 2002. Mosaic haploid-diploid embryos and polyspermy in the tellinid bivalve *Macoma balthica*. Genome 45, 59–62.

Magnesen, T., Bergh, Ø., Christophersen, G., 2006. Yields of great scallop, *Pecten maximus*, larvae in a commercial flow-through rearing system in Norway. Aquaculture International 14, 377–394.

Magnesen, T., Christophersen, G., 2008. Reproductive cycle and conditioning of translocated scallops (*Pecten maximus*) from five broodstock populations in Norway. *Aquaculture* 285, 109–116.

Martinez, G., Mettifogo, L., Perez, M.A., Callejas, C., 2007. A method to eliminate self-fertilization in a simultaneous hermaphrodite scallop. 1. Effects on growth and survival of larvae and juveniles. *Aquaculture* 459–469.

Mason, J., 1957. The age and growth of the scallop, *Pecten maximus* (L.) in Manx waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 36, 473–492.

Mason, J., 1958. The breeding of the scallop, *Pecten maximus* (L.), in Manx waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 37, 653–671.

Mason, J., 1983. Scallop and queen fisheries in the British Isles (Farnham: Fishing News Books).

Misamore, M., Silverman, H., Lynn, J. W., 1996. Analysis of fertilization and polyspermy in serotonin-spawned eggs of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Molecular Reproduction and Development* 43, 205–216.

Orensanz, J.M., Parma, A.M., Iribarne, O., 1991. Population dynamics and management of natural stocks. In *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture.*, (Amsterdam: Elsevier), pp. 625–713.

Le Pennec, G., Le Pennec, M., Beninger, P., Dufour, S., 2002. Spermatogenesis in the archaic hydrothermal vent bivalve, *Bathypecten vulcani*, and comparison of spermatozoon ultrastructure with littoral pectinids. *Invertebrate Reproduction & Development* 41, 13–19.

Le Pennec, M., 1974. Morphogenèse de la coquille de *Pecten maximus* (L.) élevé au laboratoire. *Cahiers De Biologie Marine* 15, 475–482.

Le Pennec, M., Paugam, A., Le Pennec, G., 2003. The pelagic life of the pectinid *Pecten maximus*—a review. *ICES Journal of Marine Science: Journal Du Conseil* 60, 211–233.

Poppe, G.T., Gotō, Y., 1993. European seashells. Vol II (Scaphopoda, Bivalvia, Cephalopoda). Verlag Christa Hemmen, Wiesbaden, Germany. 221 pp.

Poutiers, J.M., 1987. Pectinidae. In: Fischer, W.; M.-L. Bauchot; M. Schneider (eds.), Fiches FAO d'Identification Des Espèces Pour Les Besoins De La Pêche. (Révision 1). Méditerranée Et Mer Noir, Zone de pêche 37. Vol. I. Végétaux et Invertébrés. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

Robert, R., Gérard, A., 1999. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. Aquatic Living Resources 12, 121–130.

Shapiro, S.S., Wilk, M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52, 591–611.

Shumway, S.E., Parsons, J.G., 2006. Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture (Elsevier).

Slater, J., 2005. Spawning of king scallops, *Pecten maximus* (L.) in Mulroy Bay and the relationship with spatfall intensity. Journal of Shellfish Research 24, 951–958.

StatSoft, Inc. (2012). Electronic Statistics Textbook, Tulsa.

Strand, Ø., Nylund, A., 1991. The reproductive cycle of the scallop *Pecten maximus* (L.) from two populations in Western Norway, 60N and 64N. In An International Compendium of Scallop Biology and Culture., (Spec. Publ., World Aquaculture Society.), str. 357.

Strand, Ø., Vølstad, J.H., 1997. The molluscan fisheries and culture of Norway. NOAA Technical Report NMFS 129, 7–24.

Strathmann, R.S., 1979. Egg size, larval development and juvenile size in benthic marine invertebrates. American Naturalist 111, 373–376.

Tang, S.F., 1941. The breeding of the scallop (*Pecten maximus* L.) with a note on the growth rate. Proc. Liverpool Biol. Soc. 54, 9–28.

Tebble, N., 1966. British bivalve seashells: a handbook for identification (British Museum (Natural History), str. 221.

Togo, T., Morisawa, M., 1999. Mechanisms for blocking polyspermy in oocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Zoology* 283, 307–314.

Togo, T., Osanai, K., Morisawa, M., 1995. Existence of Three Mechanisms for Blocking Polyspermy in Oocytes of the Mussel *Mytilus edulis*. *Biological Bulletin* 189, 330.

Uutting, S.D., Millican, P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture* 155, 45–54.

Vera, J., 1992. Diccionario multilingüe de especies marinas para el mundo hispano Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica, Secretaria General Técnica, str. 1282.

Wilbur, A.E., Gaffney, P.M., 1991. Self-fertilization in the bay scallop, *Argopecten irradians*. *Journal of Shellfish Research* 10, 274.

Winkler, F.M., Estévez, B.F., 2003. Effects of self-fertilization on growth and survival of larvae and juveniles of the scallop *Argopecten purpuratus* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 292, 93–102.